



|                   |     |
|-------------------|-----|
| REC'D 09 JUL 2001 |     |
| WIPO              | PCT |

REPÚBLICA DE CUBA

13/  
12



Lic. América N. Santos Riveras, Directora General de la  
OFICINA CUBANA DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL.

**CERTIFICO:** Que bajo el número ciento treinta y cinco del año dos mil del Registro de Entrada, fue presentada en esta OFICINA CUBANA DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL la solicitud de Certificado de Autor de Invención, por CÁMARA DE MÚLTIPLES MINIGELES PARA LA ELECTROFORESIS DE CAMPO ALTERNANTE TRANSVERSALES, con fecha siete de junio de dos mil, a la una y cuatro minutos ante meridiano, por Violeta María Herrera Cabrera, Representante, ciudadana cubana, a nombre y en representación del CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CNIC), cuya invención fue creada por Ana María Riverón Rojas; Gabriel Angel Pérez Pérez; Lilia López Cánovas; Oscar Arencibia Díaz; Carlos Alberto Canino Ramos; José Alfredo Herrera Isidrón; Leonardo Ruiz Esquivel; Luis Mariano Batista Santiler y Regnar Gigato Pérez.

**ASIMISMO CERTIFICO:** Que la mencionada solicitud de Certificado de Autor de Invención, se encuentra actualmente en tramitación.

**ASIMISMO CERTIFICO:** Que el Resumen, la Memoria Descriptiva, las Reivindicaciones y los Dibujos que se acompañan, son exactamente iguales a las que obran en el expediente.

Y a petición de Violeta María Herrera Cabrera, Representante, se expide la presente en la Ciudad de La Habana, República de Cuba, a los trece días del mes de junio dos mil uno.

Lic. América N. Santos Riveras  
Directora General

**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

**CÁMARAS DE MÚLTIPLES MINIGELES PARA ELECTROFORESIS DE CAMPOS  
ALTERNANTES TRANSVERSALES.**

**MEMORIA DESCRIPTIVA**

5

**TÍTULO DE LA INVENCIÓN: CÁMARAS DE MÚLTIPLES MINIGELES PARA  
ELECTROFORESIS DE CAMPOS ALTERNANTES TRANSVERSALES**

10

**CAMPO O RAMA DE LA TÉCNICA CON LA QUE SE RELACIONA LA INVENCIÓN.**

La presente invención se relaciona con la rama de la Biología Molecular, más específicamente con los métodos de separación de moléculas intactas de ADN en gel mediante electroforesis de campos pulsantes y en particular provee cámaras para efectuar co-electroforesis de campos alternantes transversales en múltiples minigeles, tanto para pocas como para numerosas muestras de ADN (más de 40).

La invención también encuentra aplicaciones en otras ramas de la ciencia y la técnica como son:

- La Microbiología y Parasitología: Permite la obtención de cariotipos electroforéticos de parásitos protozoarios y hongos y el análisis del genoma de bacterias y virus.
- Genética Humana: Permite el análisis de regiones del genoma humano.
- En la Biotecnología: Permite la caracterización de ceparios biotecnológicos, vegetales y la creación de levaduras y bacterias que portan cromosomas artificiales.

**NIVEL CONOCIDO DE LA TÉCNICA. CARACTERÍSTICA DE LAS SOLUCIONES**

**25 TÉCNICAS ANÁLOGAS.**

La Electroforesis de Campos Pulsantes (PFGE: 'Pulsed Field Gel Electrophoresis') data de 1984, cuando Schwartz y Cantor (*Cell*, Vol. 37, pp. 67-75, 1984; Patente U.S. Nro. 4,473,452 de Septiembre 25 de 1984) observaron que las moléculas intactas de ADN (ácido desoxirribonucleico) de gran tamaño se separaban en los geles de agarosa mediante el empleo de pulsos eléctricos que alternaban periódicamente su dirección de aplicación. Como resultado de la separación se obtenían patrones de bandas característicos que fueron nombrados cariotipos moleculares. Los autores también determinaron que la separación de las moléculas dependía esencialmente de la duración de los pulsos eléctricos. Con posterioridad, se conoció que la geometría de las líneas de fuerza de los campos eléctricos alternantes, la intensidad de los

mismos, la temperatura experimental, la fuerza iónica de la solución tampón la concentración del gel de agarosa y el grosor de los bloques de agarosa donde se inmovilizan las muestras eran factores importantes que influían en la resolución que podía ser alcanzada entre dichas moléculas (Birren y Lai, Academic Press. New York, 1993, pp 107, 111, 129, 131, 135; López-Cánovas et al., J. of Chromatography A, vol. 806, pp 123-139, 1998; López-Cánovas et al., J. of Chromatography A, vol. 806, pp 187-197, 1998).

Se han desarrollado varios sistemas para realizar PFGE, los que poseen cámaras con ordenamientos de electrodos diferentes. Entre ellas se encuentran las cámaras con ordenamiento de electrodos OFAGE (del Inglés, 'Orthogonal Field Alternating Gel Electrophoresis, Carle C.F. y Olson M.V. Nucleic Acid Res. Vol. 12, pp. 5647-5664), CHEF ('Contour Clamped Homogeneous Electric Field', Chu G. Science Vol. 234, pp. 1582-1585, Diciembre 16, 1986), TAFE ('Transversal Alternating Field Electrophoresis', Laas W.A., Patterson D. y Gardiner K.J., U.S. patente Nro. 4,740,283 de abril 26 de 1988), FIGE ('Field Inversion Gel Electrophoresis', Carle G.F. y Olson M.V, US patente Nro. 4,737,251) y los miniequipos MiniTAFE y MiniCHEF (Riverón y cols.; Analytical Letters Vol. 28, pp. 1973-1991, 1995; Patente Europea Nro. 96500021.9-2204, 1995; US Patent Application 08/688,607, 1995; Patente cubana RPI Nro. 02/95, 1995).

Estos sistemas tienen en común que en sus cámaras se coloca un gel que es atravesado simétricamente por las líneas de fuerza de los campos eléctricos que se generan en los electrodos que tienen polaridad opuesta en el ordenamiento de electrodos. En ese gel se depositan las muestras que contienen las moléculas intactas de ADN que son separadas. En todas esas cámaras también existen zonas por donde pasan líneas de fuerza del campo eléctrico que no atraviesan el gel y por tanto no actúan sobre las moléculas. La zona de la cámara que contiene el gel y por la cual pasan las líneas de fuerza del campo eléctrico que actúan directamente sobre las moléculas se denominará aquí *zona útil de electroforesis (ZUE)*, mientras que las zonas de la cámara por donde pasan líneas de fuerza del campo eléctrico que no actúan sobre las moléculas la denominaremos *zonas no útiles de electroforesis (ZNU)*. Todas las cámaras existentes para realizar PFGE poseen una región ZUE y regiones ZNU.

Los sistemas que se han desarrollado para realizar PFGE se diferencian entre sí por la complejidad de la electrónica para energizar los electrodos y cambiar la orientación del campo eléctrico. También se diferencian por su capacidad, o incapacidad, de brindar trayectorias rectas de migración en los patrones de bandas. La posibilidad de obtener trayectorias rectas de migración es esencial cuando se desean comparar los patrones que brindan numerosas muestras, mientras que la sencillez en la electrónica facilita y abarata la producción de los sistemas.

Existen dos sistemas que brindan trayectorias rectas de migración de las moléculas y además poseen una electrónica sencilla para energizar los electrodos y alternar los campos eléctricos. Uno de ellos permite realizar la electroforesis en geles verticales, empleando campos alternantes transversales (TAFE) y el otro permite realizar la electroforesis en geles submarinos que se colocan horizontalmente en cámaras convencionales de dos electrodos donde se revierte periódicamente la orientación del campo eléctrico (FIGE).

Aunque la cámara y la electrónica del sistema FIGE son sencillas y existen cámaras que permiten analizar simultáneamente numerosas muestras (hasta 96 muestras, empleando dos peines de 48 dientes en la Cubeta OnePhorAll Submarine Gel System de la Jordan Scientific, Catálogo BDH, 1997, Sección E pp. 4-371), en las cámaras FIGE se observan fenómenos de inversión de la movilidad de las moléculas (Carle G.F., Frank M. y Olson M.V. Science, Vol. 232, pp. 65-68, 1986). Debido a la ausencia de teoría que prediga cuáles moléculas de ADN invertirán su movilidad bajo determinadas condiciones experimentales en el FIGE, dicha inversión limita la utilización de dichas cámaras para analizar el tamaño de las moléculas de ADN que son separadas y comparar sus patrones de bandas. Por ejemplo, ese fenómeno puede provocar que dos moléculas de ADN de tamaños diferentes migren la misma distancia en el gel, lo que impide identificarlas, salvo que se recurra a procedimientos de hibridación con sondas. Hasta el momento, las dos únicas formas de estimar el tamaño de grandes moléculas específicas de ADN separadas en experimentos de PFGE son: 1) comparar la distancia que migra la molécula en estudio con las distancias migradas por los marcadores de tallas y 2) emplear ecuaciones que describan las distancias migradas por las moléculas bajo condiciones diferentes de electroforesis y posteriormente reemplazar adecuadamente en ellas las distancias migradas y las variables experimentales. En el FIGE los marcadores de talla también pueden sufrir fenómenos de inversión de la movilidad y como se mencionó no existe teoría capaz de predecir el momento y las condiciones en que una molécula invertirá su movilidad. Estas son limitaciones serias para emplear cámaras FIGE en estudios comparativos de numerosas muestras, como ocurre, por ejemplo, en la epidemiología molecular.

El sistema TAFE fue propuesto por Gardiner, Laas y Paterson (Somatic Cell Molec. Genet. Vol. 12, pp 185-195, 1986). Denominaron inicialmente ese sistema como 'Vertical Pulsed Field Electrophoresis' (VPFE) y desarrollaron un aparato que fue protegido por la patente U.S. Nro. 4,740,283 de abril 26 de 1988. Ese sistema de separación de moléculas de ADN emplea un gel (10 cm de longitud x 7.6 cm de ancho x 0.64 cm de espesor) que se dispone verticalmente en el centro del ordenamiento de electrodos. Los cuatro electrodos se colocan paralelamente con las caras de dicho gel y a todo lo ancho del mismo, pero cada miembro de un par de electrodos

opuestos se coloca frente a una de las caras del gel. En esa versión y en todos los sistemas TAFE existentes, los cátodos quedaron ubicados en la parte superior de la cámara, a ambos lados de las caras del gel, mientras que los ánodos se colocaron en la parte inferior de la cámara en planos más alejados del gel. Esa disposición de electrodos provoca que las líneas de fuerza del campo eléctrico atraviesen transversalmente el gel y que se genere a lo largo del mismo gradientes de intensidad de campo eléctrico y del ángulo que forman dichas líneas de fuerza, por lo que las moléculas son forzadas a migrar durante cada pulso a través del grosor del gel. La migración resultante ocurre en dirección vertical, en el sentido de la fuerza de gravedad. A pesar de la existencia de esos gradientes, todos los puntos que se ubican a lo ancho del gel y a una altura dada con relación al plano que contiene ambos cátodos o ambos ánodos están a un mismo valor de potencial eléctrico. Por esa razón las moléculas de igual tamaño recorren distancias similares durante la electroforesis y migran hasta la misma altura en el gel, siguiendo trayectorias rectas, con independencia del pocillo en el cual fueron depositadas. Como se mencionó, esta es una de las ventajas que ofrece este sistema para comparar las migraciones de las moléculas de ADN que están contenidas en diferentes muestras.

Basados en esos principios, la Beckman Instruments, Inc. (**Beckman, The Geneline System Instruction Manual, ed. Spinco Division of Beckman Instruments Inc. Palo Alto, California, 1988**) construyó el equipo denominado Geneline I, o 'Transverse Alternating Field Electrophoresis System' conocido como TAFE. Este sistema emplea un gel de 11 cm de longitud x 7.2 cm de ancho x 0.6 cm de espesor. En el Geneline I los cátodos se ubican en la parte superior de la cámara y su gel admite hasta 20 muestras. Con posterioridad, la Beckman Instruments, Inc desarrolló el equipo Geneline II (**Beckman Catalogue 1992-1993. The Beckman Plus Science Support Solutions. Bulletin No 9200. Geneline II System, Pág. 35-36**) en el cual el gel se agrandó hasta 14.2 cm de largo x 15 de ancho x 0.3 cm de grosor. La característica esencial de este equipo es que puede admitir 40 muestras.

Con posterioridad se publicaron los equipos miniTAFE (**Riverón y col.; Analytical Letters Vol. 28, pp. 1973-1991, 1995; Patente Europea Nro. 96500021.9-2204, 1995; US Patent Application 08/688,607, 1995; Patente cubana RPI Nro. 02/95, 1995**) donde se realiza electroforesis de campos alternantes transversales a 8 muestras depositadas en un minigel. Estos miniequipos superaron algunas deficiencias de los sistemas anteriormente mencionados, como se explicará más adelante. No se han propuesto minicámaras FIGE para realizar PFGE.

### La realización de PFGE en los equipos TAFE y miniTAFE.

Para resolver las moléculas de ADN de gran tamaño en un patrón de bandas se requiere mucho tiempo en los equipos TAFE, Geneline I y Geneline II. Por ejemplo, el Geneline I requiere 24 horas para brindar un patrón de 11 bandas de los cromosomas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (moléculas menores de 1.6 Mb. 1 Mb =  $10^6$  pares de bases). Este mismo equipo puede necesitar hasta 90 horas para separar en 17 bandas las moléculas de ADN del genoma amibiano (Orozco E et al., Molec. Biochem. Parasitol. Vol. 59, pp. 29-40, 1993). Por otro lado, las cámaras TAFE requieren gran cantidad de la solución tampón para cubrir sus electrodos (por ejemplo, 3500 ml en la Geneline II) y durante la electroforesis la corriente es elevada y el calor que se genera puede ser grande. Si en los equipos TAFE se incrementa la diferencia de potencial aplicada entre los electrodos de polaridad opuesta se puede alcanzar el límite de corriente de la fuente de poder. Por eso, los fabricantes recomiendan que el valor máximo de campo eléctrico aplicable sea de 10 V/cm (para fuentes cuyo límite de corriente es 0.4 Amp). Esto impide que se reduzca la duración de las electroforesis mediante incrementos en la intensidad del campo eléctrico. Se ha planteado que el uso de voltajes elevados o altas temperaturas ensanchan y hacen difusas las bandas del patrón electroforético, lo que puede provocar ausencia de resolución entre las bandas. La ventaja del Geneline II es que permite analizar simultáneamente 40 muestras, lo que facilita el análisis comparativo de los patrones electroforéticos que brindan numerosas muestras.

Los equipos MiniTAFE separan los cromosomas de *S. cerevisiae* a campos eléctricos intensos (22 V/cm), brindando en los minigeles una resolución adecuada entre las bandas del patrón electroforético (Riverón et al., Analytical Letters, Vol. 28, pp. 1973-1991, 1995). Además, mediante su empleo pueden resolverse en 5 horas los cromosomas de la levadura *S. cerevisiae* a 8 volt/cm y 20 °C. Se consideran MiniTAFE los equipos que poseen menos de 15 cm de separación entre los electrodos de polaridad opuesta. Esa separación permite la construcción de cámaras pequeñas y el empleo de poco volumen de la solución tampón para cubrir los electrodos (350 ml). Cuando en los MiniTAFE se aplica un voltaje dado, es decir un cierto valor de intensidad de campo eléctrico 'E', se genera menos calor que el que se generaría en los equipos TAFE donde se aplicara ese valor de 'E'. Las muestras depositadas en los minigeles de los miniequipos emplean poco material biológico y ellas se incluyen en bloques de agarosa de 0.1 a 0.05 cm de grosor, lo cual además brinda bandas más finas y reduce el tiempo que requiere la electroforesis para brindar un patrón dado de bandas (López-Cánovas et al., J Chromatography A, 806, pp. 187-197, 1998). El tamaño de los minigeles depende de la separación entre los electrodos de polaridad opuesta. En los minigeles pueden aplicarse tantas

muestras como sea posible depositar a lo ancho del mismo, por ejemplo para un gel de 4.0 x 4.0 x 0.5 cm (ancho x alto x espesor) se pueden aplicar hasta 10 muestras de 2.5 mm de ancho, separadas 1 mm.

5    **Insuficiencias de los equipos TAFE (Geneline I, Geneline II) y MiniTAFE.**

A pesar de las ventajas expuestas, los equipos mencionados poseen insuficiencias que limitan sus aplicaciones en el análisis de numerosas muestras. En particular, cuando entre un experimento y otro varía considerablemente la cantidad de muestras que se desean comparar o estudiar. Parte de esas insuficiencias se relacionan con la forma y la distribución de las dimensiones de la cámara y 10 con la existencia de una región *ZUE* única. Las insuficiencias fundamentales de esos sistemas pueden desglosarse de la siguiente forma:

- Las cámaras siempre emplean la misma cantidad de reactivos, independientemente de la cantidad de muestras que serán estudiadas.
- No se han optimizado las cámaras. Las relaciones entre las dimensiones de las cámaras (alto, ancho y profundidad) no se distribuyeron para garantizar que la corriente en la cámara no sobrepase fácilmente los límites de salida de las fuentes de poder de PFGE y además las moléculas se separen rápidamente a campos eléctricos elevados.
- Para que pueda incrementarse el número de zonas *ZUE* deben realizarse modificaciones constructivas importantes en las cámaras existentes, las que pueden afectar el buen funcionamiento de los sistemas. Esto influye en la optimización del uso de reactivos.

20    **Descripción detallada de las insuficiencias.**

Como se mencionó, las cámaras TAFE (Geneline I, Geneline II) y MiniTAFE poseen una plataforma de electrodos en la que se coloca un gel (o dos geles en el Geneline II) cuya anchura es igual al ancho de la cámara y su altura depende de la separación entre los electrodos de polaridad opuesta (es decir, poseen una región *ZUE*). En el (los) gel(es), pueden depositarse tantas muestras como permita su ancho, el ancho de dichas muestras y la separación entre ellas. Los equipos con una región *ZUE* emplean un volumen constante de la solución tampón para cubrir sus electrodos.

30    Si la cantidad de muestras que se deseara analizar simultáneamente sobrepasara la capacidad máxima de análisis de las *ZUE* de cualquiera de las cámaras mencionadas (por ejemplo, más de 8 en el MiniTAFE, más de 20 en Geneline I y más de 40 muestras para el Geneline II) sería necesario hacer varias electroforesis, por lo que los patrones de bandas no serían totalmente comparables. Por ejemplo, si se desea caracterizar el genoma de 100 aislados de un

microorganismo determinado, ya sea que provengan de un cepario de la industria biotecnológica, de aislados de personas, animales, o vegetales infectados; entonces, esas tres cámaras presentan insuficiencias en su capacidad de analizar simultáneamente más de 8, 20 ó 40 muestras, respectivamente, o son insuficientes las posibilidades que brindan para ampliar su capacidad de análisis. Por eso, cuando es necesario realizar coelectroforesis de numerosas muestras para comparar los patrones de bandas que brindan las moléculas de ADN de dichas muestras, la capacidad máxima de análisis del TAFE (Geneline I, Geneline II) y MiniTAFE puede ser sobrepasada.

Una solución conocida, que aumentaría dos veces la capacidad de análisis de muestras de las 10 cámaras mencionadas, es la implementada en la cubeta FIGE OnePhorAll. Esta consistiría en colocar dos peines en el gel de la ZUE. Uno de ellos al inicio del gel y el otro a mediados del mismo. Sin embargo, en el sistema TAFE, las muestras colocadas en los pocillos que formarían ambos peines no estarían sujetas al mismo campo eléctrico ni ángulo de reorientación, por lo que, las moléculas de tallas similares migrarían distancias diferentes en el gel y los patrones de 15 bandas no serían comparables.

Otra solución posible sería construir cámaras más anchas con el gel y zonas ZUE más anchas. Esa solución fue implementada en el Geneline II y supuestamente debería permitir analizar múltiples muestras (en nuestro caso más de 40). Por eso, el Geneline II fue diseñado con una cubeta poco profunda y ancha, pero alta y fue necesario colocar dieléctricos entre los electrodos 20 y el gel para se obtuviera el gradiente de ángulo del sistema TAFE. Esos dieléctricos retardaron considerablemente las corridas. Además, la corriente eléctrica en la cámara depende directamente del área de sección transversal que ella ofrece al flujo de iones, por eso, en esas cubetas muy altas y anchas circula una corriente elevada, que supera las del Geneline I y VPFE 25 inicial, por lo que aplicando voltajes bajos se alcanza antes el límite de corriente ( $I_{max}$ ), o de potencia ( $P_{max}$ ) de la fuente de poder. Por ejemplo, Macrodrive I, LKB:  $I_{max} = 0.4$  Amp,  $V_{max} = 500$  volts,  $P_{max} = 200$  Watts; PowerPack 3000 de la Biorad, Cat. 1998-1999:  $I_{max} = 0.4$  Amp,  $V_{max} = 3000$  volts,  $P_{max} = 400$  Watts; Consort E802, Cat. BDH 1997:  $I_{max} = 2$  Amp,  $V_{max} = 300$  volts,  $P_{max} = 300$  Watts ( $V_{max}$ ,  $I_{max}$  y  $P_{max}$ : límites de voltaje, corriente y potencia, respectivamente). Entonces, en ese tipo de cámaras no es posible 30 incrementar la intensidad del campo eléctrico para reducir el tiempo de electroforesis. Los campos eléctricos poco intensos alargan innecesariamente la duración de los experimentos de PFGE, lo que reduce el espectro de aplicaciones de esas cámaras en ramas de la ciencia y la técnica que requieren la consecución rápida de resultados. Además, ellas emplean mucho más

volumen de reactivos que las existentes. De hecho, la Beckman Instruments ha descontinuado el sistema Geneline II.

Pudieran diseñarse cámaras MiniTAFE más anchas (máximo campo eléctrico aplicable de 25 V/cm para alrededor de 6 cm de ancho), pues ellas no son profundas ni altas (máxima separación entre los electrodos de polaridad opuesta de 15 cm). Por eso, su área de sección transversal puede aumentar hasta que brinde un valor de corriente eléctrica ( $I$ ) que al aplicar un valor adecuado de  $E$  (por ejemplo 8-10 V/cm) aún no exceda los valores máximos de salida de las fuentes de poder existentes. Esas cámaras emplearían además menos volumen de la solución tampón que las cámaras TAFE, Geneline I y Geneline II actuales. En ellas, se obtendrían en tiempo relativamente breve los patrones de bandas. No obstante, una región  $ZUE$  muy ancha emplearía un minigel muy ancho, el que presentaría dificultades para ser fundido y manipulado. Por otro lado, pudieran emplearse varios minigels, pero según la fórmula I, esa cámara no sería eficiente cuando se fueran a analizar pocas muestras.

Por otro lado, cuando es necesario analizar pocas muestras, por ejemplo 8, se desperdicia mucha capacidad de análisis en los geles de los equipos TAFE, Geneline I y Geneline II, pues ellas poseen una región  $ZUE$  única y soportan 20 ó 40 muestras, respectivamente. Los reactivos empleados en los experimentos de PFGE son caros. Los equipos aprovecharían eficientemente sus capacidades de separación de moléculas de ADN si el volumen de reactivos que cada vez emplearan las cámaras dependiera de la cantidad de muestras que se fuese a analizar en ese experimento. Eso es imposible en las cámaras de un solo  $ZUE$  pues emplean un volumen constante de reactivos. Puede definirse el volumen de reactivos en exceso (ER %) que emplean las cubetas de un  $ZUE$  como

$$ER (\%) = 100.0 * (N_t - N) / N_t \quad (I)$$

25 donde:

N<sub>t</sub>: Cantidad máxima de muestras que pueden aplicarse en un minigel.

N: Cantidad de muestras realmente aplicadas en un experimento

(N<sub>t</sub> - N): Cantidad de muestras que no se aplicaron en el gel

30 La Tabla 1 muestra los valores de ER en los sistemas Geneline II y MiniTAFE. A medida que se emplean menos muestras ER crece en ambas cámaras, lo que pone en evidencia que ellas emplean reactivos en exceso cuando se aplican pocas muestras. Aunque el MiniTAFE (datos en la columna 2, Tabla 1) emplea menos volumen de reactivos que el TAFE, ese volumen tampoco varía con la cantidad de muestras analizadas. Por tanto, el volumen de reactivos que emplean las

cámaras TAFE Geneline I, Geneline II y MiniTAFE es constante e independiente de la cantidad de muestras que se va a analizar, lo que impide emplearlos óptimamente.

**Tabla 1.** Exceso de reactivos (ER %) empleados en el Geneline II (GL-II) y MiniTAFE.

| N (Nro. Muestras Aplicadas) | TAFE GL-II<br>Bc = 3500 | MiniTAFE<br>Bc = 325 |
|-----------------------------|-------------------------|----------------------|
|                             | ER (%)                  | ER (%)               |
| 1                           | 97.5                    | 87.5                 |
| 2                           | 95.0                    | 75.0                 |
| 3                           | 92.5                    | 62.5                 |
| 4                           | 90.0                    | 50.0                 |
| 5                           | 87.5                    | 37.5                 |
| 6                           | 85.5                    | 25.0                 |
| 7                           | 82.5                    | 12.5                 |
| 8                           | 80.0                    | 0.0                  |
| 9                           | 77.5                    | --                   |
| 10                          | 75.0                    | --                   |
| 11                          | 72.5                    | --                   |
| 12                          | 70.0                    | --                   |
| 13                          | 67.5                    | --                   |
| 14                          | 65.0                    | --                   |
| 27                          | 32.5                    | --                   |
| 40                          | 0.0                     | --                   |

5

--: Significa que el gel no tiene esos pocillos.

ER: Es el porcentaje de exceso de reactivos que se emplea

GL-II: Geneline II.

Bc: Volumen total en ml de solución tampón en la cubeta.

10

Además, la solución tampón se agota durante la electroforesis. Por eso, para diseñar óptimamente la forma y dimensiones de las cámaras es necesario conocer el tiempo que demora dicha solución en agotarse.

Por otro lado, las cámaras que separan moléculas de ADN empleando el sistema TAFE usan un gel que se coloca verticalmente y sus cátodos se ubican en su parte superior. Por eso, la dirección

15

resultante de la migración es paralela a la del vector de la fuerza de gravedad. Para evitar accidentes con los electrodos al colocar el gel, el Geneline I posee dos plataformas desmontables de electrodos y el gel se coloca en la cámara antes de ubicar dichas plataformas. Para implementar esa solución es necesario ubicar correctamente los electrodos en las plataformas y 5 posicionar correctamente el gel con respecto a las plataformas. Sin embargo, este ‘doble posicionamiento’, de los electrodos en las plataformas y de éstas con relación al gel, puede variar la disposición relativa entre el gel y los electrodos. Así, este aspecto debe ser mejorado en las cámaras.

Como se mencionó, en las cámaras existentes hay zonas por donde pasan las líneas de fuerza del 10 campo eléctrico que no actúan directamente sobre las moléculas depositadas en el gel (*ZNU*). Esas regiones no juegan un papel esencial en la separación de las moléculas de ADN.

### ESENCIA DE LA INVENCIÓN

15 La presente invención brinda un conjunto de cámaras para realizar electroforesis de campos alternantes transversales (Sistema TAFE). Las cámaras presentadas poseen una capacidad elevada de análisis de muestras y también pueden analizar pocas muestras sin perder su optimización ni la rapidez de análisis. En ellas se contempla que el gasto de reactivos dependa de 20 la cantidad ‘N’ de muestras que se desea analizar en cada experimento, que el usuario pueda variar la cantidad de regiones *ZUE* que empleará en cada experimento y que el tiempo de electroforesis sea pequeño. De las cámaras se han eliminado las zonas *ZNU*, o las mismas pueden ser eliminadas según la voluntad del usuario. Las soluciones propuestas descansan sobre las siguientes bases:

1-Para construir cámaras TAFE anchas que resuelvan en tiempo breve a las moléculas de ADN 25 (por ejemplo, en 10 -12 horas los cromosomas de *S. cerevisiae* a 8.33 V/cm y 15 °C) contenidas en numerosas muestras (más de 40) debe estimarse el ancho máximo (‘L’) que puede tener dicha cámara. Este puede ser calculado ‘a priori’ a partir de ecuaciones que describan la corriente en la cámara. Para obtener las ecuaciones, primero se ajusta la función que describe a la conductancia específica ‘ρ’ (mho.cm<sup>-1</sup>) del tampón TBE 0.5 X (1 X TBE: Tris 89 mM/L, Ácido Bórico 89 mM/L y EDTA 2 mM/L, pH 8) en función de la concentración molar del Tris ([Tris]) y de la 30 temperatura experimental ‘T’ (°C).

$$\rho = 5.190 \times 10^{-3} * [Tris]^{0.8461} * e^{0.02214 * T} \quad (III)$$

Se considera que la corriente inicial (' $I_0$ ', en Amp) en la cámara depende de la resistencia del electrolito, la que está dada por la relación entre la constante de la vasija (' $Cv$ ', en  $\text{cm}^{-1}$ ) y  $\rho$ . ' $\rho$ ' es la conductancia específica y la constante de la vasija depende de 'A', o área ( $\text{cm}^2$ ) de sección transversal que ofrece la cámara al paso de la corriente, y de 'l', que es la separación entre los electrodos de polaridad opuesta.

5 Ya que las cámaras no poseen formas geométricas perfectas es necesario determinar las constantes de las vasijas ( $Cv = l/A$ ) para anchos y formas diferentes. Para determinarlas se ideó el siguiente procedimiento:

- Se determina la constante de la celda de un conductímetro  $Cv(\text{cond})$ .
- 10 -Se llena la cámara de electroforesis con una solución de cualquier electrolito conocido que se mantiene a una temperatura fija.
- Se mide la conductividad de dicho electrolito empleando la celda calibrada del conductímetro  $G(\text{cond})$ .
- 15 -Se mide la conductividad del electrolito, conectando los electrodos de la cámara de electroforesis a los conectores de medición del conductímetro  $G(\text{cámara})$ .
- Es fácil deducir que  $Cv(\text{cámara})$  se obtiene:

$$Cv(\text{cámara}) = [G(\text{cond}) * Cv(\text{cond})] / G(\text{cámara}) \quad (\text{III})$$

20 En cámaras TAFE de anchos (' $L_i$ ') diferentes se determina  $Cv(\text{cámara})$ ; Entonces puede obtenerse la función que relaciona  $Cv$  con  $L$ :

$$Cv(\text{cámara})_i = f(L_i) \quad (\text{IV})$$

25 Entonces, en las cámaras de anchos  $L_i$ , las resistencias (' $R_{ei}$ ') al paso de la corriente que brindan electrolitos de conductividad  $\rho_j$  están dadas por:

$$R_{ei} = Cv(\text{cámara})_i / \rho_j \quad (\text{V})$$

30 Desde los estudios iniciales de conductividad se conoce que al aplicar voltaje con una fuente de poder de corriente directa, la corriente que puede medirse en un electrolito no depende solamente de ' $R_e$ '. En realidad, ocurre polarización del electrolito, lo cual reduce el valor del campo eléctrico y de la corriente que circula. Por eso, para poder diseñar cámaras TAFE de anchos

variables es necesario disponer de las funciones que describen la atenuación del campo eléctrico que provoca la polarización del electrolito.

- La atenuación del campo eléctrico en cámaras de electroforesis que tengan anchos y formas geométricas diferentes puede ser estimada si se conoce  $R_e$  (ecuaciones II, IV y V) y se considera que la resistencia total ( $R$ ) que se mide en la solución tampón depositada en la cámara puede modelarse como dos resistencias colocadas en serie,  $R_e$  y  $R_p$
- 5

$$R = R_e + R_p, \quad (VI)$$

- 10 donde  $R_p$  juega el papel de resistencia adicional inducida por la polarización del electrolito.  
Entonces, de acuerdo con la ley de Ohm

$$V_{DC} = I_{DC} * R \quad (VII)$$

- 15 donde el voltaje que se aplica con la fuente de corriente directa es  $V_{DC}$  y la corriente directa que se mide  $I_{DC}$ . Si se aplican valores crecientes de  $V_{DC}$  y se determina  $I_{DC}$  pueden calcularse los valores de  $R_t$  y estimar  $R_p$  a partir del conocimiento de  $R_e$  (ec. V) en esa cámara. De esa manera se puede obtener la función que relacione  $R_p$  con  $R_e$  y con  $V_{DC}$

20  $R_p = f(R_e, V_{DC}) \quad (VIII)$

- Mediante el empleo de las ecuaciones anteriores pueden ser predichas las corrientes iniciales ( $I_0$ ) que se obtendrían para voltajes  $V_{DC}$  en cámaras de diferentes anchos que contienen tampones de conductividades diferentes y en las que la temperatura de electroforesis se mantiene constante.
- 25 Por tanto, para fuentes de electroforesis cuyas salidas de corriente, voltaje y potencia son conocidas, puede estimarse el ancho máximo que puede tener cada cámara que se emplee con cada fuente existente. Ese ancho es aquel que brinda valores de  $I_0$  y de potencia ( $P$ ) que no sobrepasan los valores máximos de salida de la fuente. El voltaje que brinda ese  $I_0$  o esa  $P$  es el voltaje máximo que puede aplicarse en dicha cámara. Por tanto, el principio esencial para diseñar cámaras TAFE anchas y óptimas es que deben construirse aquellas que, según los  $I_0$  predichos por las ecuaciones II – VIII, admiten campos eléctricos de al menos 8 V/cm.
- 30

Para diseñar cámaras TAFE anchas, además de poder predecir  $I_0$ , hay que considerar el agotamiento del buffer, o sea que la electroforesis dure el tiempo necesario para separar las moléculas. Por eso, hay que disponer de ecuaciones que predigan el tiempo que demorará la

solución tampón en agotarse. El tiempo de agotamiento del tampón debe depender al menos de 'E'. La ecuación para describir a la constante de agotamiento de la solución tampón ('k', en Ohm  $t^{-1}$ ) puede ser obtenida partiendo del supuesto que cuando se aplica un voltaje 'V<sub>DC</sub>' (en volts) la corriente I<sub>DC(t)</sub> (en Amp) en cualquier momento de la electroforesis está dada por I<sub>DC(t)</sub>

5 = V<sub>DC</sub> / R(t), donde,

$$R(t) = R + kt \quad (X)$$

$$k = f(E) \quad (XI)$$

10 y R se calcula según la ecuación VI. Así, mediante el empleo de esas ecuaciones puede predecirse I<sub>0</sub> y como varía la corriente durante la electroforesis, por lo que puede conocerse el momento de recambio de la solución tampón en cada experimento. Las ecuaciones pueden obtenerse empíricamente, colocando la solución tampón en la cámara, regulando la temperatura, 15 aplicando el voltaje y monitoreando la corriente ('I<sub>t</sub>') durante el tiempo ('t'). Con posterioridad se emplean métodos de regresión para el ajuste de las variables.

De acuerdo con las ecuaciones anteriores mientras mayor sea la altura que tenga la solución tampón en la cámara, mayor será el área de sección transversal y por ende la corriente. Entonces mientras menores sean los valores de altura pueden aplicarse valores mayores de 'E', de tal forma que 'I<sub>0</sub>' no exceda un cierto valor umbral de la máxima salida de corriente de la fuente de 20 poder de ECP. Por tanto, para construir cámaras donde 'L' (la dimensión paralela a los electrodos) sea grande es necesario que la altura de la solución tampón ('h') y la separación entre los electrodos de polaridad opuesta ('l') sea pequeña, garantizando que para los valores de 'E' 25 que separan rápidamente los cromosomas, la corriente inicial no exceda el umbral convenido de salida máxima de las fuentes convencionales de ECP. Ya que 'E' provee la fuerza motriz de la electroforesis y la potencia (V\*I) aumenta proporcionalmente con el decrecimiento de 'l' y cuadráticamente con 'V', los equipos cuya separación entre electrodos de polaridad opuesta es pequeña garantizan además la resolución rápida de cromosomas. Por tanto, las cámaras deben ser del tipo MiniTAFE.

30 Aunque las cámaras sean anchas y posean separación pequeña entre electrodos opuestos, sólo serán óptimas aquellas capaces de soportar simultáneamente varios minigel, los que puedan excluirse (o no) de los experimentos junto con el volumen correspondiente de tampón. La subdivisión del minigel ancho en varios minigel más estrechos se logra eficientemente si la cámara se divide en varias regiones ZUE. Cuando en esos minigel se depositan todas las

muestras que ellos admiten, entonces esas cámaras trabajarán a su máxima capacidad y podrán analizar simultáneamente numerosas muestras. Sin embargo, se desperdiciaría capacidad de análisis y reactivos si sólo se analizaran pocas muestras. Para evitarlo, es necesario que sólo se activaran las *ZUE* que se requieran y se excluyan del experimento las no empleadas. De esa forma, el volumen de reactivos que se emplee dependerá cada vez de la cantidad de muestras que se desea analizar y por tanto de la cantidad de regiones *ZUE* que se activen. Esto se evidencia si retomamos la **fórmula I** y definimos.

|    |                    |  |
|----|--------------------|--|
|    | Bc:                | Volumen de reactivos en ml (de la solución tampón o agarosa) que requiere la cámara completa.                      |
| 10 | Bzue:              | Volumen de reactivos en ml que se requiere por cada <i>ZUE</i> donde pueden separarse un máximo de 'NM' muestras.  |
|    | Bnt:               | Cantidad de reactivos en ml empleados cuando se activa una cantidad dada de <i>ZUE</i> (Nzue). $Bnt = Nzue * Bzue$ |
| 15 | Nt                 | Cantidad máxima de muestras que puede aplicarse en las <i>ZUE</i> activadas $Nt = NM * Nzue$ .                     |
|    | (Nt - N):          | Cantidad de muestras que no se aplicaron en el experimento.  |
|    | (Bnt/Nt):          | Volumen de reactivos empleados por cada muestra.   |
| 20 | (Nt - N)*(Bnt/Nt): | Volumen de reactivos en exceso cuando se aplican 'N' muestras y es posible aplicar 'Nt' muestras.                  |

Si el volumen de reactivos en exceso se relaciona con el volumen de reactivos que requiere la cámara completa ('Bc') y nombramos 'ER' al resultado, se obtiene:

$$25 \quad ER (\%) = 100.0 * Bnt * (Nt - N) / (Nt * Bc) \quad (XII)$$

Si aplicamos la relación XII a una cámara de cuatro *ZUE*, donde cada una requiere 325 ml de la solución tampón y admite un minigel que porta 13 muestras, obtendremos para 'ER' los valores mostrados en la **Tabla 2**. En ese ejemplo, el comportamiento de 'ER' va desde un valor máximo de 23.1 cuando 'N' es 1, 14, 27 y 40 muestras hasta un mínimo cuando 'N' es 13, 26, 39 ó 52 muestras (**Tabla 2**). Observe que se propone que cuando solo se emplee una *ZUE*, las tres restantes se inactiven y ocluyan, por lo que,  $Bnt = 325$  ml y  $Nt = 13$ . Así deberá ser si solo se emplearan la primera y segunda miniplataformas; entonces  $Bnt = 650$  ml y  $Nt = 26$ . Se procede de igual manera con las restantes miniplataformas. En las cámaras de una sola *ZUE*, como el

Geneline II,  $N_t = 40$ ,  $B_c = B_{nt} = 3500$  ml, mientras que en el MiniTAFE  $N_t = 8$ ,  $B_c = B_{nt} = 350$  ml. Por eso,  $B_c = B_{nt}$  y  $ER = (N_t - N)/N_t$  (Tabla 1). Por tanto, las cámaras deben estar subdivididas en varias regiones *ZUE* subdividiendo o no la plataforma de electrodos, pero sin perder la capacidad de efectuar coelectroforesis de la cantidad de muestras que se desee, ni gastar reactivos excesivamente, ni emplear más de una fuente de poder.

5

**Tabla 2.** Volumen de reactivos en exceso ('ER') en una cámara de cuatro *ZUE* que admite electroforesis de campos alternantes transversales (MultiMiniTAFE) en cuatro minigelos.

| $B_c = 1300$ ml                                   |       |  |       |  |       |   |       |
|---|-------|--|-------|--|-------|---|-------|
| ZUE 1<br>$N_t = 13$ $B_{nt} = 325$<br>$N = 1..13$ |       | ZUE 2<br>$N_t = 26$ , $B_{nt} = 650$<br>$N = 14..26$ |       | ZUE 3<br>$N_t = 39$ , $B_{nt} = 975$<br>$N = 27..39$ |       | ZUE 4<br>$N_t = 52$ , $B_{nt} = 1300$<br>$N = 40..52$ |       |
| N   | ER(%) | N  | ER(%) | N  | ER(%) | N   | ER(%) |
| 1   | 23.1  | 14   | 23.1  | 27   | 23.1  | 40  | 23.2  |
| 2   | 21.2  | 15   | 21.2  | 28   | 21.2  | 41  | 21.2  |
| 3   | 19.2  | 16   | 19.2  | 29   | 19.2  | 42  | 19.2  |
| 4   | 17.3  | 17   | 17.3  | 30   | 17.2  | 43  | 17.3  |
| 5   | 15.4  | 18   | 15.4  | 31   | 15.4  | 44  | 15.4  |
| 6   | 13.5  | 19   | 13.5  | 32   | 13.5  | 45  | 13.5  |
| 7   | 11.5  | 20   | 11.5  | 33   | 11.5  | 46  | 11.5  |
| 8   | 9.6   | 21   | 9.6   | 34   | 9.6   | 47  | 9.6   |
| 9   | 7.7   | 22   | 7.7   | 35   | 7.7   | 48  | 7.7   |
| 10  | 5.8   | 23   | 5.8   | 36   | 5.8   | 49  | 5.8   |
| 11  | 3.8   | 24   | 3.8   | 37   | 3.8   | 50  | 3.8   |
| 12  | 1.9   | 25   | 1.9   | 38   | 1.9   | 51  | 1.9   |
| 13  | 0.0   | 26   | 0.0   | 39   | 0.0   | 52  | 0.0   |

- 10 En estas cubetas el volumen de reactivos (' $B_{nt}$ ' en ml) que se emplea durante cada electroforesis depende de la cantidad máxima de muestras que se vaya a analizar (' $N_t$ ') en cada experimento. Todas las *ZUE* de una cámara TAFE deben activarse con una sola fuente de poder y deben emplear un solo sistema de alternar los campos. El 'doble posicionamiento' de los electrodos y del gel puede evitarse invirtiendo el ordenamiento 15 de electrodos. Si se considera que la fuerza motriz de la electroforesis la provee el campo

eléctrico, que esta fuerza es muy superior a la de gravedad y que por su pequeña masa, las moléculas no pueden sedimentar por la acción de la fuerza de la gravedad; entonces es indudable que las moléculas siempre migrarán en la dirección de la resultante entre las líneas de fuerza de ambos campos eléctricos. Por tanto, es posible invertir el ordenamiento de electrodos. Ese ordenamiento invertido lo denominaremos configuración TAFE invertida.

De las cámaras pueden ser eliminadas las regiones ZNU. Esas regiones no juegan un papel esencial en la separación de las moléculas de ADN. Por tanto, ellas pueden ser eliminadas sin afectar la separación entre las moléculas. Todas las cámaras para realizar PFGE poseen regiones ZNU.

Como resultado de la invención, se proveen cámaras de electroforesis del sistema TAFE en su versión MiniTAFE que son anchas y poseen múltiples zonas ZUE que pueden ser activadas o no a voluntad y energizadas con una sola fuente de poder. Por tanto, en esas cámaras pueden colocarse múltiples minigeles y separar simultáneamente las moléculas de ADN contenidas en pocas o en gran cantidad de muestras; por ejemplo, en 10, 20, 30, 40 o más muestras diferentes.

Para llevar a cabo la separación de esas moléculas, dichas cámaras emplean la cantidad de reactivos que se requiere para analizar las 'N' muestras, cuyas moléculas serán separadas en un tiempo 't'.

- 1) La separación entre los electrodos de polaridad opuesta es la descrita para el MiniTAFE, por eso separan las moléculas rápidamente.
- 2) Las cámaras son anchas, hasta donde lo permitan las ecuaciones II -VIII y los valores de salida máximos de las fuentes de poder de PFGE (ver el ejemplo en la Tabla 3), por eso son capaces de separar las moléculas contenidas en al menos 52 muestras de 2.5 mm de ancho.
- 3) Las cámaras poseen *varias zonas útiles de electroforesis (ZUE)*, que pueden ser empleadas en los experimentos o pueden ser ocluidas e inactivadas y solo requieren una fuente de poder y un sistema para alternar los campos eléctricos. Por eso emplean eficientemente los equipos.
- 4) La subdivisión de la cámara en varios ZUE simula un ancho variable y hace que 'Nt' y 'Bnt' varíen con la cantidad de ZUE empleados en la cámara (vea en la Tabla 2 el ejemplo de una cámara de 4 ZUE). El volumen de la solución tampón se reemplaza según predicen las ecuaciones II, III, IV y V. Por eso pueden analizar muchas o pocas muestras empleando los reactivos eficientemente.
- 5) Las cámaras pueden construirse con la *configuración TAFE convencional o configuración TAFE invertida* y pueden ser de acrílico, teflón o cualquier otro material de elevada constante dieléctrica.

- 6) Las regiones que no son útiles en la electroforesis (*ZNU*) se ocluyen con piezas de la forma apropiada que se construyen con material de elevada constante dieléctrica, o se eliminan de las cámaras mediante cualquier procedimiento constructivo.

Pueden existir varias cámaras con las características mencionadas, las llamaremos tipo I y tipo II.

- 5 Las cámaras tipo I: Son las más simples y como todas estas cámaras poseen una distancia pequeña entre sus electrodos opuestos, son poco profundas, poco altas, pero son anchas. *Sus electrodos son tan largos como ancha es la cámara*. Poseen una plataforma de electrodos que puede estar fija en la cámara o puede ser desmontable. Las cámaras tipo I pueden poseer los cátodos en su parte superior (*Configuración TAFE convencional*), o en la parte inferior de las mismas (*Configuración TAFE invertida*). En este último caso, las muestras se depositan en la parte inferior de los minigeles, por lo que en cada uno de ellos las moléculas migrarán en el sentido opuesto al de la fuerza de la gravedad.

- Cuando los electrodos se disponen en *configuración TAFE invertida* las regiones *ZNU* pueden ser eliminadas con las propias paredes de la cámara por donde se deslizan los electrodos. Esas paredes deben formar un ángulo pequeño con el plano que contiene el cátodo y el ánodo que se ubican en el mismo lado del gel, por lo que al igual que dicho plano, esas paredes formarán un ángulo con el fondo de la cámara de electroforesis. En las cámaras con *configuración TAFE convencional* las regiones *ZNU* se eliminan colocando en la cámara piezas de la forma apropiada y construidas de un material de elevada constante dieléctrica (Ver ejemplos de realización de cámaras tipo I. **Figuras 1 y 2**).

- Esas cámaras poseen varias regiones *ZUE* y soportan varios minigeles que se colocan a todo su ancho, uno a continuación del otro. Para lograrlo, pueden diseñarse marcos del ancho de la cámara. Ese marco se subdivide en marcos más estrechos donde se funden simultáneamente todos los minigeles. El marco grande se coloca posteriormente en la cámara y sirve de soporte a todos los minigeles que se emplearán, permitiendo la manipulación de los mismos. Los minigeles también pueden ser fundidos simultáneamente en esos marcos, después extraídos de los mismos y depositados directamente en la cámara. Para ello, la cámara debe poseer en su centro piezas ranuradas lateralmente por donde puedan deslizarse dichos minigeles. La separación entre estas piezas será igual al ancho del minigel que pueda soportar, es decir al ancho de una *ZUE*. Para fundir los minigeles el marco debe colocarse entre planchas planas de acrílicos que contemplen donde colocar el peine. Todas esas piezas son fijadas entre sí. El marco puede tener ranuras laterales para fijar el peine en una sola posición.

A su vez cada minigel admite una cantidad máxima de muestras, lo que depende de su ancho. De esta forma se dispondrá de cámaras con varias regiones *ZUE*, que admiten uno o varios

minigeles y pueden separar pocas o muchas muestras simultáneamente con una fuente de poder y electrodos comunes. El volumen de solución tampón empleada dependerá de la cantidad de ZUE empleadas. Así todas las muestras de todos los ZUE son además separadas en una solución tampón común, la temperatura del experimento es la misma para todas ellas y el voltaje aplicado es el mismo.

De acuerdo con todos los principios anteriores se logra que sean variables la cantidad de minigeles que se colocan en la cámara y el volumen de reactivos ('Bnt') empleados por cada experimento. También se logra variabilidad en la cantidad máxima de muestras ('Nt') que pueden analizarse simultáneamente en una coelectroforesis.

10 Ejemplo de realización de cámaras tipo I:

En la figura 1 se muestra una vista isométrica en explosión de la cámara (1). En la vista se muestran los cuatro electrodos (2) en configuración TAFE convencional. La anchura (3) de la cámara es de 316 mm, la altura (5) es 74 mm y la profundidad (6) es de 114 mm. También se señalizan la pared frontal (8) y lateral (9) de la cámara. El fondo (18) de la cámara posee la excavación (7) sobre la cual descansa el marco (16) donde se funden los minigeles (20) que emplea esta cámara. En las paredes laterales (9) se ubican las ranuras (4) por las cuales se desliza el marco (16). Las dimensiones del marco son: 48 mm de altura, 320 mm de ancho y 5 mm de grosor. Este marco soporta 4 minigeles (20) de 38 mm de altura y 71.25 mm de ancho. Se muestra la ubicación de los pocillos (21) en los minigeles (20). Esos pocillos se forman al colocar un multipeine cuyos dientes son de 3 mm de ancho y se separan entre sí 2 mm.

20 La figura 1 también muestra un esquema tridimensional de la tapa (22), de los bloques (17) que se colocan para eliminar de la cámara las regiones ZNU, y de los bloques (15) que se colocan para eliminar de la cámara las regiones ZUE.

La figura 2 muestra los detalles de la vista lateral de la cámara (1). Señalizado con cruces (+) se muestra la ubicación de los extremos de los electrodos (2) en dicha pared, con los cátodos colocados en su parte superior y los ánodos en la inferior. Los electrodos son de 316 mm de longitud y se colocan paralelos con la pared frontal (8 en la figura 1) de la cámara. En el centro de la pared lateral (9 en la figura 1) y equidistante de los ánodos o cátodos se ubica la ranura (4) por donde se desliza el marco (16) que contiene los minigeles, o sólo los minigeles de 5 mm de espesor. Sombreados con líneas inclinadas se muestra la ubicación de los bloques (17) que eliminan de la cámara las regiones ZNU, la tapa (22) de la cámara y el fondo (18). Las caras externas de los bloques (17) son paralelas a las paredes frontales (8) de la cámara, mientras que sus caras internas pueden formar un pequeño ángulo con el plano que contiene al cátodo y al

ánode de un mismo lado del gel. Existen tantos bloques 17 como regiones ZUE haya en la cámara. Los bloques (15) se emplean para ocluir regiones ZUE.

La cámara 1 (figura 1) posee cuatro regiones ZUE. En las regiones ZUE activas se colocan los bloques 17 (figura 2) que eliminan las regiones ZNU. Para ocluir las regiones ZUE que se

5 inactiven, se sustituyen los bloques 17 (figura 2) por los bloques 15 (figura 2) de sección rectangular. En las regiones ZUE inactivas no se coloca minigel.

Para fundir los minigeles 20 (figura 1) se coloca el marco 16 (figura 1) sobre una placa de acrílico, teflón u otro material apropiado y se ubica el multipeine, o peines aislados. Con posterioridad, se vierte la agarosa, como se hace convencionalmente y se cubre con placas apropiadas.

10 Para efectuar la electroforesis se colocan las muestras en los pocillos (21) de los minigeles (20, figura 1), estos se colocan en la cámara (1, figura 1), deslizando el marco (16, figura 1) por las ranuras (4, figura 1). Las ZUE que no serán empleadas se ocluyen con los bloques (15, figura 2) y en las ZUE que se emplearán se colocan los bloques (17, figuras 1 y 2). La cámara (1, figura 15) se llena con la solución tampón y los electrodos (2, figura 1) se energizan a través de la unidad de conmutación de los campos eléctricos mediante una fuente de poder. Para mantener la temperatura constante se recircula solución tampón fría. Las mangueras de entrada y salida para el enfriamiento de la solución tampón se colocan en las paredes frontales (8 en la figura 1) de la cámara 1.

20 La figura 3 muestra los 52 patrones de bandas (24) que brindaron los cromosomas de *S. cerevisiae* en los cuatro minigeles (20 en la figura 1) de la cámara (1, figura 1). Esos patrones fueron obtenidos a 8.33 V/cm, 15 °C, en agarosa 1.5%, solución tampón TBE 0.5 X, 12 horas de electroforesis y 80 segundos de duración de los pulsos eléctricos. Los minigeles fueron fundidos en el marco (16 en la figura 1) como se describió anteriormente.

25 Con experimentos realizados en la cámara (1, figura 1), empleando la solución tampón TBE 0.5x, 1.5% de Agarosa (Lachema), una, dos, tres o las cuatro regiones ZUE, y para altura constante de buffer, se obtuvo para la ecuación IV:

$$C(\text{vasija}) = a_0 + a_1 (I/L)^{0.1}$$

30

Donde  $a_0 = -0.786$  y  $a_1 = 1.047$  y poseen varianzas de  $1.451 \times 10^{-4}$  y  $1.6949 \times 10^{-4}$  respectivamente. Ambos coeficientes difirieron significativamente de cero. Se obtuvo además para la ecuación VIII

$$R_p^{0.5} = -1.522 + Re * 2.1096 * 10^{-2} + 87.31/V_{DC} + \text{Temperature} * 2.2697 * 10^{-2}$$

Los coeficientes de las ecuaciones se determinaron con mediciones de  $V_{DC}$  e  $I_{DC}$  en las cámaras.

Lo que permitió estimar  $I_0$  y los valores máximos de  $E$  que pueden aplicarse en cámaras

- 5 MultiMiniTAFE (Tabla 3). Los resultados están calculados para las fuentes de poder más empleadas en PFGE. Este procedimiento se usó para seleccionar las dimensiones de las cámaras que fueron construidas. Como era de esperar, la polarización del electrolito  $I_0$  no depende linealmente del campo.

Para la constante de agotamiento se obtuvo:

10

$$k = -3.6365 * 10^{-2} + \text{Campo} * 1.6135 * 10^{-2}$$

Tabla 3. Intensidades máximas de campo eléctrico ('E') que pueden aplicarse en cámaras MMTAFE de diferentes anchos, empleando varias fuentes de poder PFGE.

| Fuente de Poder                  | Ancho cm | E volt/cm T= 10 °C | E volt/cm T= 15 °C | E volt/cm T= 20 °C | E volt/cm T= 25 °C | E volt/cm T= 30 °C |
|----------------------------------|----------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Imax=0.4<br>Vmax=500<br>Pmax=200 | 10       | 25.8               | 22.6               | 19.9               | 17.4               | 15.4               |
|                                  | 20       | 17.4               | 15.4               | 13.5               | 11.9               | 10.6               |
|                                  | 30       | 13.0               | 11.5               | 10.3               | 9.1                | 8.1                |
|                                  | 40       | 10.3               | 9.1                | 8.1                | 7.2                | 6.4                |
|                                  | 50       | 8.2                | 7.3                | 6.5                | 5.8                | 5.3                |
| Imax=1.0<br>Vmax=600<br>Pmax=300 | 10       | 49.6               | 46.4               | 43.5               | 40.8               | 37.9               |
|                                  | 20       | 40.6               | 37.9               | 33.5               | 29.5               | 26.0               |
|                                  | 30       | 32.3               | 28.6               | 25.3               | 22.3               | 19.9               |
|                                  | 40       | 25.3               | 22.4               | 19.9               | 17.7               | 15.7               |
|                                  | 50       | 20.3               | 17.9               | 15.9               | 14.2               | 12.6               |
| Imax=2.0<br>Vmax=300<br>Pmax=300 | 10       | 38.3               | 38.3               | 38.3               | 38.3               | 38.2               |
|                                  | 20       | 38.3               | 38.2               | 35.8               | 33.6               | 31.7               |
|                                  | 30       | 35.3               | 33.1               | 31.2               | 29.2               | 27.6               |
|                                  | 40       | 31.2               | 29.3               | 27.6               | 26.0               | 24.5               |
|                                  | 50       | 27.8               | 26.2               | 24.6               | 23.3               | 21.9               |

- 15 'E' se estimó con las ecuaciones II, III, IV y V. Imax: corriente máxima (en Amp) de salida de la fuente, Vmax: voltaje máximo (en volts) de salida de la fuente, Pmax: potencia máxima (en

Watts) de salida de la fuente. MMTAFE: MultiminiTAFE. Los valores de 'E' se estimaron para el 85% de  $I_{max}$ ,  $V_{max}$  y  $P_{max}$  de las fuentes de poder empleadas.

Por otro lado, de acuerdo con las ecuaciones ajustadas si se emplea una fuente de poder cuya salida máxima de potencia es 200 Watts y 0.4 Amp, se obtendrá que cuando se usan la cuatro 5 cámaras, 20°C, los valores de 'E' cercanos a 10 V/cm requieren que la solución tampón se reemplace cada una hora, lo cual indica que cuando se emplean las cuatro regiones *ZUE* la cámara no es eficiente para esos valores de campo eléctrico. En el ejemplo de la Figura 3, los 10 patrones de bandas de ADN cromosomales de *S. cerevisiae* contenidas en las 52 muestras se obtuvieron en sólo 12 horas, pero fue necesario cambiar 1 L de solución tampón después de 7 horas de electroforesis. Ese tiempo coincide bien con lo predicho por las ecuaciones.

Puede diseñarse una variante de la cámara anterior que no emplee los bloques (17, figura 1) que eliminan las regiones *ZNU*. Sus ventajas y deficiencias son similares a la de la anterior, pero emplean mayor cantidad de reactivos, la corriente eléctrica y por tanto, la potencia que se genera 15 en ellas es mayor. No obstante la solución tampón demora más tiempo en agotarse. También pueden diseñarse variantes de estas cámaras con *configuración TAFE invertida*. El diseño de cámaras con electrodos ordenados en *configuración TAFE invertida* se muestra a continuación en el ejemplo de cámaras tipo II.

De acuerdo con los principios anteriores se logra que sea variable la cantidad de *ZUE* que puede 20 ser activada en este tipo de cámara, el número de minigelos que empleará en un experimento, y el volumen de reactivos ('Bnt') por experimento. También se logra variabilidad en la cantidad máxima de muestras ('Nt') que pueden analizarse simultáneamente en una coelectroforesis.

**Las cámaras tipo II.** Una variante de cámara que se propone en esta invención y que evita el empleo de electrodos muy largos se describe a continuación. Al igual que las cámaras tipo I, las 25 cámaras tipo II poseen una distancia pequeña entre sus electrodos opuestos, por lo que tienen pocas profundidad y altura. Sin embargo, cada región *ZUE* está contenida en una miniplataforma de electrodos y estas pueden ser extraídas de la cámara y se colocan una detrás de otra. Cada una de ellas emplea un minigel en el que se depositan tantas muestras como admite su anchura, la que a su vez depende de la longitud de los electrodos de las miniplataformas.

30 Los electrodos de una o varias miniplataformas pueden ser energizados o no empleando una sola fuente de poder. Para lograrlo, los electrodos de las miniplataformas se conectan en paralelo, es decir los ánodos consecutivamente y los cátodos consecutivamente. A diferencia de las cámaras tipo I, las regiones *ZUE* (o miniplataformas de electrodos) que no serán activadas en un experimento cualquiera pueden ser totalmente ocluidas con piezas que poseen una forma similar

a la de la miniplataforma. Esas piezas se fabrican de un material de elevada constante dieléctrica. La conexión en paralelo entre las miniplataformas de la cámara garantizan la continuidad entre los electrodos de todas las miniplataformas de electrodos y permiten que se realice la coelectroforesis a todas las muestras de todos los minigeles con una fuente de poder y electrodos comunes. Así, todas las muestras son además separadas en una solución tampón común, la temperatura del experimento es la misma para todas ellas y el voltaje aplicado es el mismo para todas. De acuerdo con los principios anteriores se logra que sea variable la cantidad de *ZUE* que puede ser activada en la cámara, el número de minigeles que se empleará en un experimento, y el volumen de reactivos ('Bnt') por experimento. También se logra variabilidad en la cantidad máxima de muestras ('Nt') que puede analizarse simultáneamente en una coelectroforesis.

En las cámaras tipo II, las múltiples miniplataformas de electrodos podrían poseer sus cátodos en su parte superior (*configuración TAFE convencional*) o en su parte inferior (*configuración TAFE invertida*).

En las cámaras tipo II, donde los electrodos se disponen en *configuración TAFE invertida* las regiones de la solución tampón por donde pasan las líneas de fuerza que no atraviesan el gel pueden ser eliminadas con las propias paredes de la cámara. Para lograrlo, las paredes frontales de la cámara por donde se deslizan los electrodos deben formar un ángulo pequeño con el plano que contiene el cátodo y el ánodo que se ubican en el mismo lado del gel (o formar un ángulo pequeño con dicho plano), por lo que al igual que dicho plano, esas paredes formarán un ángulo con el fondo de la cámara de electroforesis.

En la construcción de las cámaras tipo II, puede emplearse cualquier procedimiento o conexión para activar e inactivar las miniplataformas. Por ejemplo, colocar en la tapa los cables de conexión entre miniplataformas vecinas, o solo colocar en la tapa los conectores y que los cables sean exteriores, o colocar esas conexiones en las paredes de la cámara, o directamente entre las miniplataformas. Por otro lado, las miniplataformas pueden ser de cualquier forma que se ajuste bien a la cámara, siempre y cuando contengan su ordenamiento de electrodos en configuración TAFE, mientras que los electrodos de las miniplataformas pueden ser puestos permanentemente en la cámara, o en miniplataformas que pueden ser desmontadas de dicha cámara. Las regiones de la cámara donde no se van a activar miniplataformas, pueden ser eliminadas del experimento por cualquier procedimiento, ya sea colocando en ellas un bloque macizo, o bloques huecos que se fijan de cualquier manera a las paredes o se llenan de cualquier líquido. De manera similar a como se hace con las cámaras tipo I, los minigeles pueden ser fundidos en marcos, que pueden o no colocarse en la electroforesis.

Ejemplo de realización de las cámaras tipo II:

Las figura 4 - 7 muestran varias vistas de una cámara tipo II de 3 miniplataformas desmontables de electrodos.

La figura 4 muestra la vista lateral en explosión de un corte de la cámara (34), la miniplataforma desmontable de electrodos (25) y el marco (30) que sostiene al gel (31) y las muestras (36). En la miniplataforma (25) los cátodos (26) están en el fondo de la cámara, mientras que los ánodos (27) están en la parte superior (*configuración TAFE invertida*). Las paredes exteriores (28) juegan el mismo papel que los bloques (17) de las cámaras tipo I (figuras 1 y 2), es decir, juegan el mismo papel que los bloques (17) de las cámaras tipo I (figuras 1 y 2), es decir, eliminan las regiones ZNU. En la parte central de la miniplataforma está presente la ranura (29) por donde se desliza el marco (30) que contiene el minigel (31) de esa miniplataforma. Las piezas (40) de las miniplataformas (25) contienen los conductos (41) por donde pasan las mangueras para la recirculación de la solución tampón en la cámara.

Se muestra además las paredes frontales (33) de la cámara (34) donde pueden colocarse opcionalmente las miniplataformas (25). Cuando se emplea la cámara (34), las paredes de las miniplataformas (28) se ranuran (32) para comunicar toda la solución tampón que circula por la cubeta. Durante el montaje o desmontaje de las miniplataformas, las piezas (40) se deslizan por ranuras (35) hechas en las paredes frontales (33) de la cámara (34).

La figura 5 muestra la vista superior de la cámara (34) con sus tres miniplataformas de electrodos (25) colocadas.

La figura 6 muestra una vista superior de la cámara (34) y de algunos detalles descritos en las figuras anteriores. En la vista se esquematiza que en la cámara sólo se colocó una miniplataforma de electrodos (25). Las dos regiones restantes, donde se podrían ubicar otras dos miniplataformas, se ocultan con las piezas (42) que se construyen de un material de elevada constante dieléctrica.

La figura 7 muestra la vista superior de la tapa (55), los conectores (43 y 45) y las conexiones eléctricas (44 y 46). Los cátodos (26 en la figura 4) de las tres miniplataformas se conectan en paralelo mediante los conectores 43 y las líneas eléctricas 44, mientras que los ánodos (27 en la figura 1) se conectan en paralelo mediante los conectores 45 y las líneas eléctricas 46. De esta forma los electrodos de todas las miniplataformas adquieren continuidad. En esta cámara cada miniplataforma tiene su marco (30) para sostener el gel (31). Las muestras (36 en la figura 4) se colocan en la parte inferior del gel, pues los electrodos están ordenados en *configuración TAFE invertida*.

Para llevar a cabo las electroforesis en esta cámara, primero se decide cuántas miniplataformas (25) se activarán y las restantes se ocultan o inactivan con las piezas (42). Se funden los

minigeles (31) de manera similar a como se realiza en las cámaras tipo I y se colocan las muestras. Después se colocan en las miniplataformas los marcos contenido los minigeles y muestras. Estos pueden depositarse en la cámara antes o despues de añadir la solución tampón. Una vez concluido el proceso, se conecta la tapa y los electrodos se energizan a través de la unidad de conmutación de los campos eléctricos, la que se conecta a la fuente de poder.

5

Se adjuntan las siguientes figuras:

Figura 1-3. Esquemas de cámaras tipo I y patrones electroforéticos.

- Figura 1. Vista en explosión del esquema tridimensional de una cámara tipo I con su arreglo de electrodos en *configuración TAFE convencional*, las ranuras por donde se desliza el marco, que contiene todos los minigeles de las cuatro ZUE de la cámara y las muestras. También se muestran esquemas tridimensionales del marco, los minigeles y la tapa con los bloques que eliminan las regiones ZNU o eliminan regiones ZUE.
- Figura 2. Vista lateral de una cámara tipo I, de los bloques que eliminan las regiones ZNU, del ordenamiento de electrodos en configuración TAFE convencional y del bloque que ocuye las regiones ZUE que no se emplearán en una electroforesis.
- Figura 3. Patrones de bandas que brindaron los cromosomas de *S. cerevisiae* cuando fueron separados en los cuatro minigeles que emplea la cámara tipo I de la figura 1. Las moléculas fueron separadas a 8.33 V/cm, 15 °C, durante 12 horas de electroforesis en 1.5 % de agarosa, y solución tampón TBE 0.5 X y para 80 segundos de duración de los pulsos eléctricos. A las 20 7 horas se reemplazó un litro de solución tampón.

Figuras 4-7. Esquemas de las características distintivas de las cámaras tipo II.

- Figura 4. Vista en explosión de un corte lateral de la cámara tipo II, una de sus miniplataformas de electrodos en configuración *TAFE invertida* con su marco y su gel y la ubicación de las muestras en la parte inferior del gel. Las miniplataformas de electrodos son desmontables.
- Figura 5. Vista en planta de la parte superior de la cámara de 3 miniplataformas de electrodos en la cual se han colocado las tres miniplataformas.
- Figura 6. Vista en planta de la parte superior de la cámara de tres miniplataformas de electrodos en la cual se ha colocado solo una miniplataforma. Las restantes se han ocultado con piezas de la forma y material apropiados.
- Figura 7. Vista en planta de la parte superior de la tapa de la cámara. Se muestran las conexiones eléctricas y las conexiones entre todas las miniplataformas de electrodos.

### VENTAJAS DE LA SOLUCIÓN PROPUESTA:

Las principales ventajas de las cámaras propuesta en esta invención son:

- 1) Soportan la existencia de numerosas *ZUE*, que pueden ser activadas u ocluidas según requiera el experimento. Tanto las cámaras tipo I como tipo II pueden poseer varias *ZUE*, por lo que admiten más de un minigel y pueden analizar pocas, muchas o numerosas muestras. Vea el ejemplo donde se muestran los patrones electroforéticos de los cromosomas de *S. cerevisiae* (Figura 3) obtenidos efectuando coelectroforesis a 52 muestras que fueron depositadas en cuatro minigeles en una cámara tipo I. En las cámaras tipo I y II, la cantidad máxima de muestras ('Nt') que pueden ser analizadas en una electroforesis es un múltiplo del número de *ZUE* de la cámara.
- 2) La coelectroforesis de pocas o numerosas muestras se realiza en poco tiempo. Tanto las cámaras tipo I como tipo II pueden separar las moléculas de ADN contenidas en múltiples muestras (52) de manera rápida. Por ejemplo, cuando se emplean cuatro minigeles, 80 segundos de duración del pulso, 8.33 volts/cm y 15 °C, solo se requieren 12 horas.
- 3) La cantidad de reactivos que emplean las cámaras tipo I y II depende de la cantidad de muestras que se deseen analizar y por tanto de la cantidad de *ZUE* que se activen ('Nzue'). Se cumple que el volumen de reactivos que se coloca en la cámara es  $Bc = Nzue * Bnt$ .
- 4) En las cámaras se cumplen ecuaciones que permiten diseñar óptimamente sus dimensiones y seleccionar los valores máximos de campo eléctrico que pueden ser aplicados en ellas. El campo eléctrico máximo que puede aplicarse depende de la longitud de los electrodos en las cámaras tipo I y de la cantidad de miniplataformas que se activarán en las cámaras tipo II, siempre que el resto de los parámetros de la ecuaciones se mantengan constantes y se seleccione adecuadamente la fuente de poder.
- 5) Tanto las cámaras tipo I como tipo II pueden emplear menos volumen de solución tampón, ya que pueden eliminarse las regiones *ZNU* por donde pasan las líneas de fuerza del campo eléctrico que no actúan sobre el movimiento de las moléculas.
- 6) Las cámaras con los electrodos dispuestos en *configuración TAFE invertida* son simples de construir y facilitan la manipulación de los minigeles durante los experimentos.
- 7) Los minigeles de las cámaras tipo I y II emplean muestras delgadas, por lo que ahorran reactivos biológicos y reducen el tiempo de electroforesis.
- 30) Esas cámaras son útiles para realizar estudios de epidemiología molecular, análisis de ceparios, analizar clonajes en vectores YAC y BAC y cualquier otra aplicación que involucre gran cantidad de muestras

## REIVINDICACIONES

- 1- Cámara de múltiples minigeles para electroforesis de campos alternantes transversales caracterizada por poseer un tamaño en la dimensión paralela a los cátodos y ánodos ('L' en cm) de hasta 50 cm, cámara que en esa misma dimensión puede estar subdividida en múltiples zonas útiles de electroforesis (múltiples ZUE) las que pueden portar un minigel cada una y en las que las zonas no útiles de electroforesis fueron excluidas de la cámara.
- 2- Cámara de múltiples minigeles para electroforesis de campos alternantes transversales de acuerdo con la reivindicación No. 1 caracterizada porque las múltiples ZUE están colocadas secuencialmente en una sola plataforma con electrodos largos, que pueden llegar a ser hasta de 50 cm de longitud y en ellas se colocan los minigeles en los que se depositan tantas muestras como puedan ser ubicadas según su ancho y el ancho de dichos minigeles.
- 3- Cámara de múltiples minigeles para electroforesis de campos alternantes transversales de acuerdo con la reivindicación No. 1 caracterizada porque las múltiples ZUE se ubican en miniplataformas de electrodos que pueden poseer un minigel o más cada una, con arreglos de electrodos físicamente aislados unos de otros que pueden ser conectados entre sí en paralelo y adquirir continuidad para que al energizarlos con una sola fuente de poder todas las muestras depositadas en cada minigel de cada miniplataforma y todas las muestras de todos los minigeles de todas las plataformas estén sometidas a las mismas condiciones de electroforesis.
- 4- Cámaras de múltiples minigeles para electroforesis de campos alternantes transversales de acuerdo con la reivindicación No. 1, caracterizada porque la cantidad de ZUE que se activan o emplean simultáneamente en la cámara puede variar desde 1 hasta la cantidad máxima de ZUE y las que no son empleadas se eliminan de la electroforesis mediante inactivación y oclusión con piezas de la forma apropiada que están construidas con un material de alta constante dieléctrica.
- 5- Cámara de múltiples minigeles para electroforesis de campos alternantes transversales de acuerdo con las reivindicaciones No. 1 y 4, caracterizada porque dependiendo de la cantidad de ZUE que se activen en ella se pueden imponer campos eléctricos máximos entre 8 y 25 V/cm

cuando se emplea el tampón de electroforesis TBE 0.5 X y se mantiene a una temperatura constante de hasta 30 °C.

6- Cámaras de múltiples minigeles para electroforesis de campos alternantes transversales de acuerdo con las reivindicaciones No. 1 y 4, caracterizada por emplear una cantidad variable de tampón y minigeles en su interior, cantidad que se determina de acuerdo con el número de muestras que se requiera analizar simultáneamente, activando solamente el número mínimo de ZUE necesarias para contener todas las muestras que serán analizadas e inactivando el resto por oclusión con materiales de alta constante dieléctrica que posean la forma apropiada.

10 7- Cámaras de múltiples minigeles para electroforesis de campos alternantes transversales de acuerdo con la reivindicación No. 1, caracterizada porque el número de ZUE en las que se puede subdividir está comprendido entre 1 y 30.

15 8- Cámara de múltiples minigeles para electroforesis de campos alternantes transversales de acuerdo con la reivindicación No. 1 caracterizada porque, o bien se ubican los cátodos de las miniplataformas de electrodos en el fondo de la cámara de electroforesis, los ánodos en su parte superior, y la región de los minigeles que contienen las muestras en la parte inferior de la cámara, con lo que las muestras depositadas en los múltiples minigeles migran en el sentido contrario al de la fuerza de gravedad; o bien se ubican los cátodos en la parte superior de la cámara, los ánodos en la inferior y la parte de los geles que contienen las muestras en la parte superior de la cámara con lo que las muestras migran en el sentido de la fuerza de gravedad.

25 9- Cámara de múltiples minigeles para electroforesis de campos alternantes transversales según la reivindicación No. 1, caracterizada porque se excluyen de la corrida electroforética las ZNU, que son aquellas porciones de la solución tampón donde las líneas de fuerza de los campos eléctricos generadas en cualquiera de las direcciones de aplicación de dichos campos no atraviesan el gel, exclusión que se realiza ya sea mediante la oclusión de partes de la cámara con materiales de constante dieléctrica elevada, o porque la cámara se construye con las paredes exteriores a lo ancho de la misma a una distancia no mayor de 2 centímetros del plano imaginario que contiene al cátodo de un campo eléctrico y al ánodo del otro campo eléctrico.

CÁMARAS DE MÚLTIPLES MINIGELES PARA ELECTROFORESIS DE CAMPOS  
ALTERNANTES TRANSVERSALES.

**RESUMEN**

5

La presente invención se relaciona con la rama de la Biología Molecular, más específicamente con los métodos de separación de moléculas intactas de ADN en gel mediante electroforesis de campos pulsantes, y en particular provee cámaras para efectuar coelectroforesis de campos alternantes transversales en múltiples minigel, tanto para pocas como para numerosas muestras de ADN (más de 40).

En las cámaras de la invención el rango de separación entre los electrodos de polaridad opuesta está comprendido entre 1 y 15 cm los cuales se ordenan en configuración TAFE ('Transversal Alternating Field Electrophoresis'), ya sea ubicando los cátodos en la parte superior de la cámara (*configuración TAFE conocida*) o en la parte inferior de la misma (*configuración TAFE invertida*), según lo cual las moléculas de ADN migrarán en el sentido de la fuerza de gravedad o en sentido opuesto a esta, respectivamente. Las cámaras se subdividen en varias *zonas útiles de electroforesis* (ZUE) que soportan un minigel cada una y tantas muestras como admita cada minigel. Esas ZUE pueden estar incluidas en una plataforma de electrodos largos y continuos, o en varias miniplataformas de electrodos cortos que pueden ser desmontables. En cada electroforesis, algunas o todas las ZUE de la cámara pueden ser activadas empleando una sola fuente de poder. Las ZUE no activadas se ocultan con piezas de la forma apropiada que se construyen con material de elevada constante dieléctrica. La posibilidad de activar selectivamente las ZUE permite que, entre experimentos, varíe la cantidad de minigel que se colocan en la cámara, la cantidad máxima de muestras que pueden analizarse y el volumen de reactivos que emplea la cámara en la coelectroforesis. Pueden excluirse de las cámaras las zonas por donde pasan las líneas de fuerza del campo eléctrico que no actúan sobre las moléculas (*zonas no útil de electroforesis: ZNU*).

## AUTORES

|                              |      |
|------------------------------|------|
| Ana María Riverón Rojas      | 30 % |
| Gabriel Ángel Pérez Pérez    | 15 % |
| Lilia López Cánovas          | 15 % |
| Oscar Arencibia Díaz         | 15 % |
| Carlos Alberto Canino Ramos  | 10 % |
| José Alfredo Herrera Isidróñ | 4 %  |
| Leonardo Ruiz Esquivel       | 4 %  |
| Luis Mariano Batista         | 4 %  |
| Regnar Gigato Pérez          | 3 %  |

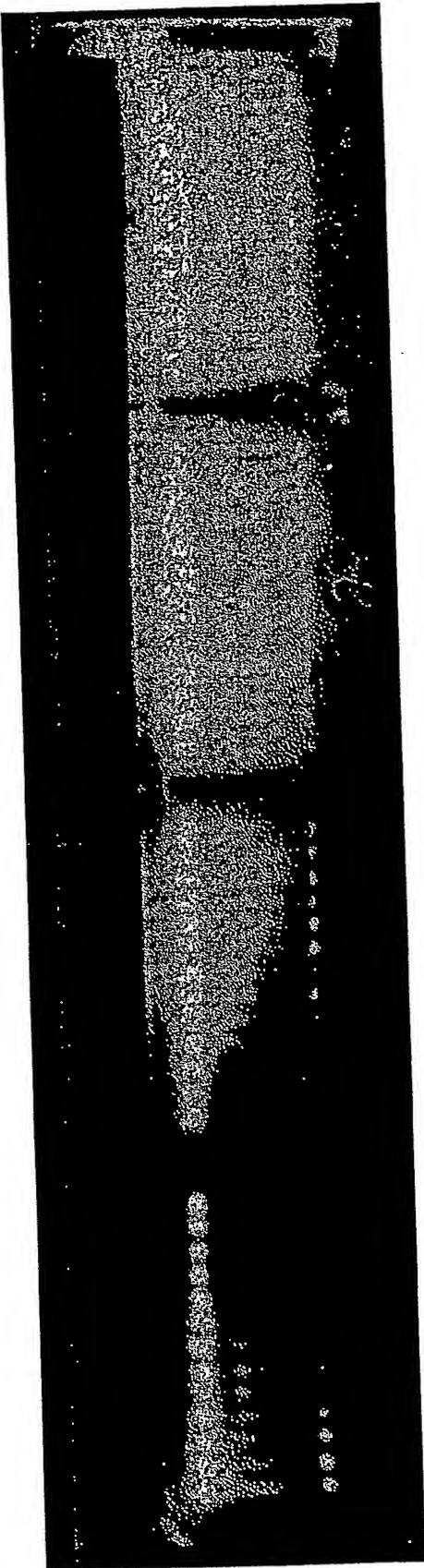


Fig. 3

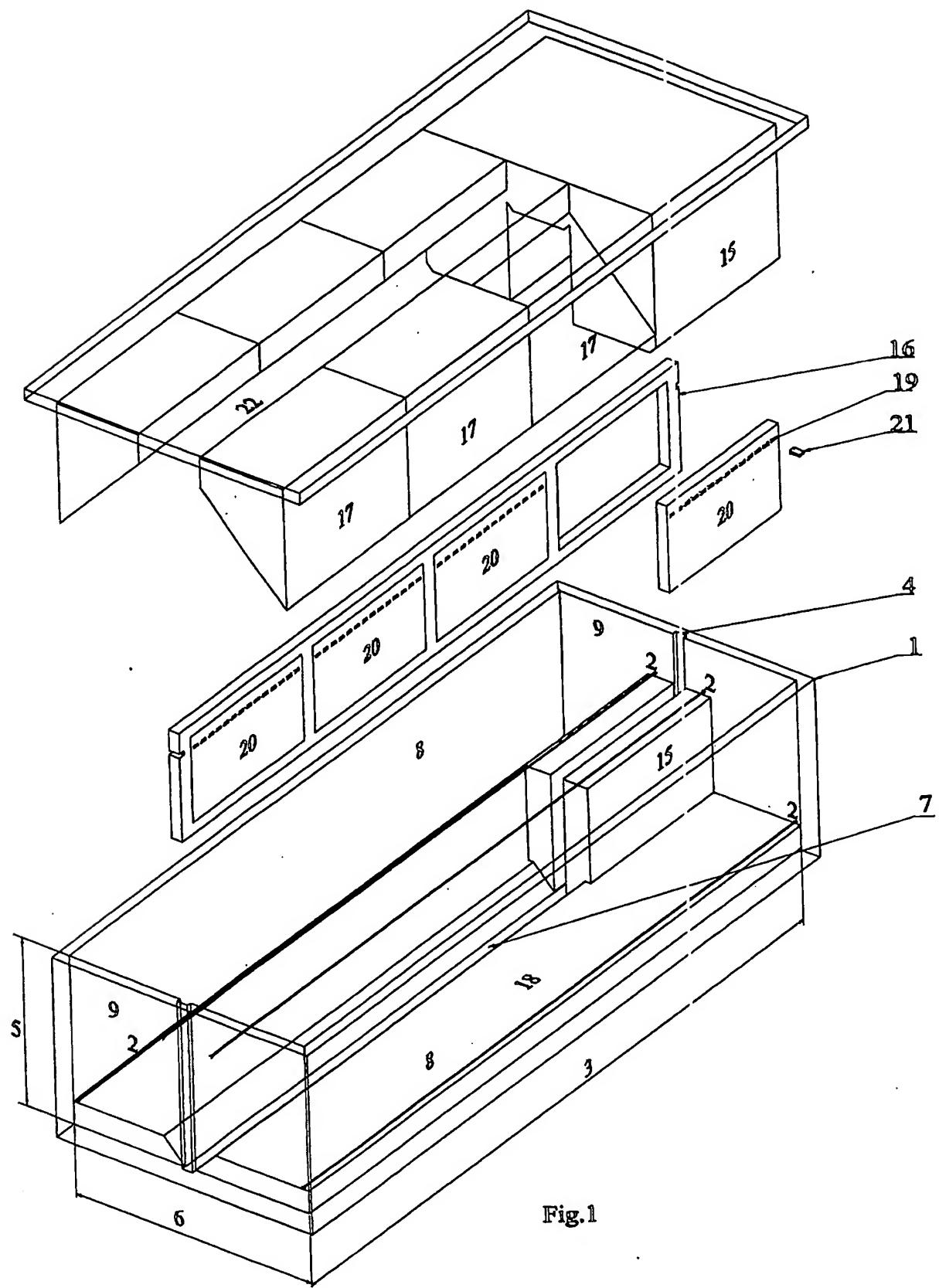


Fig.1

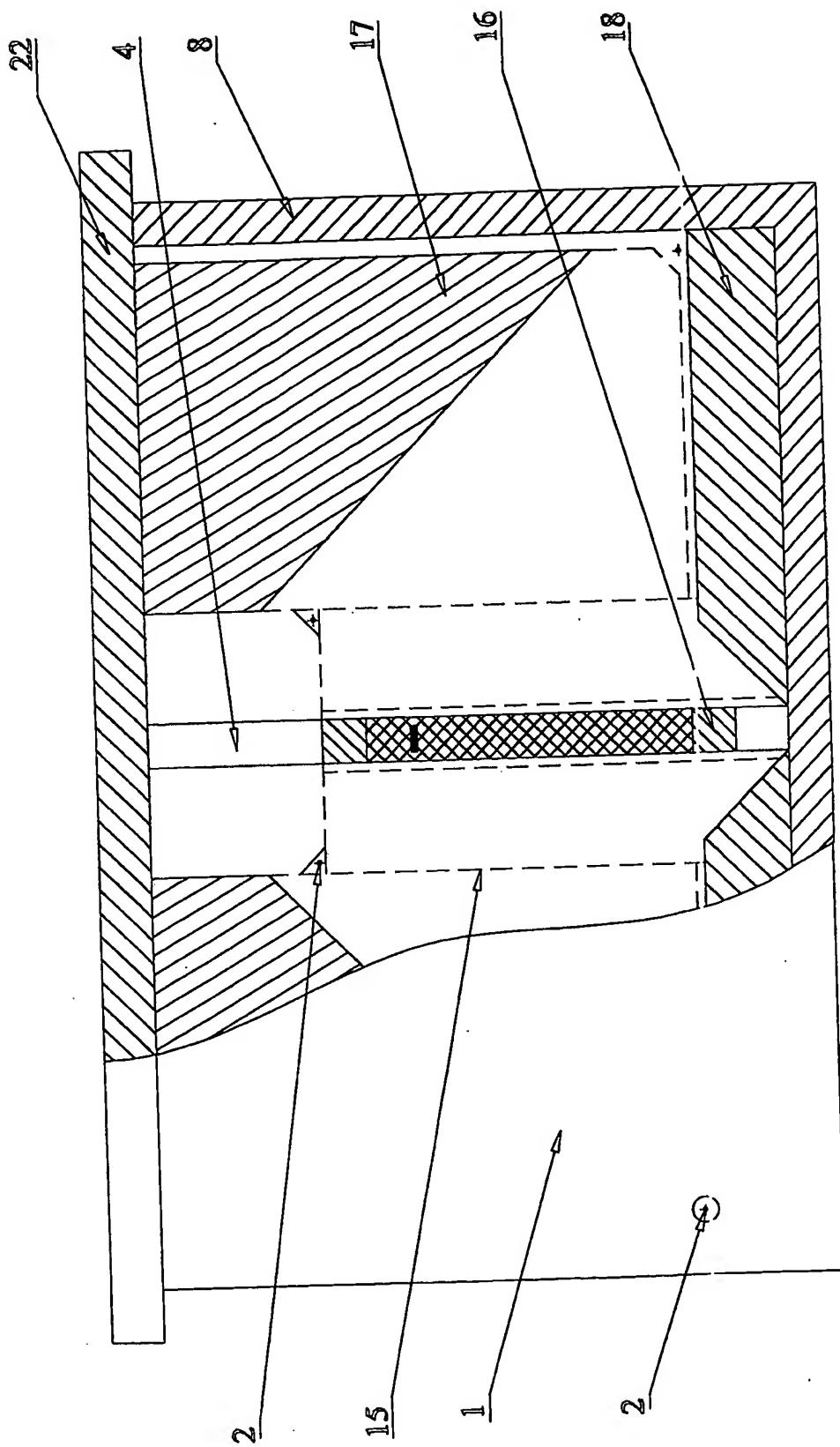


Fig. 2

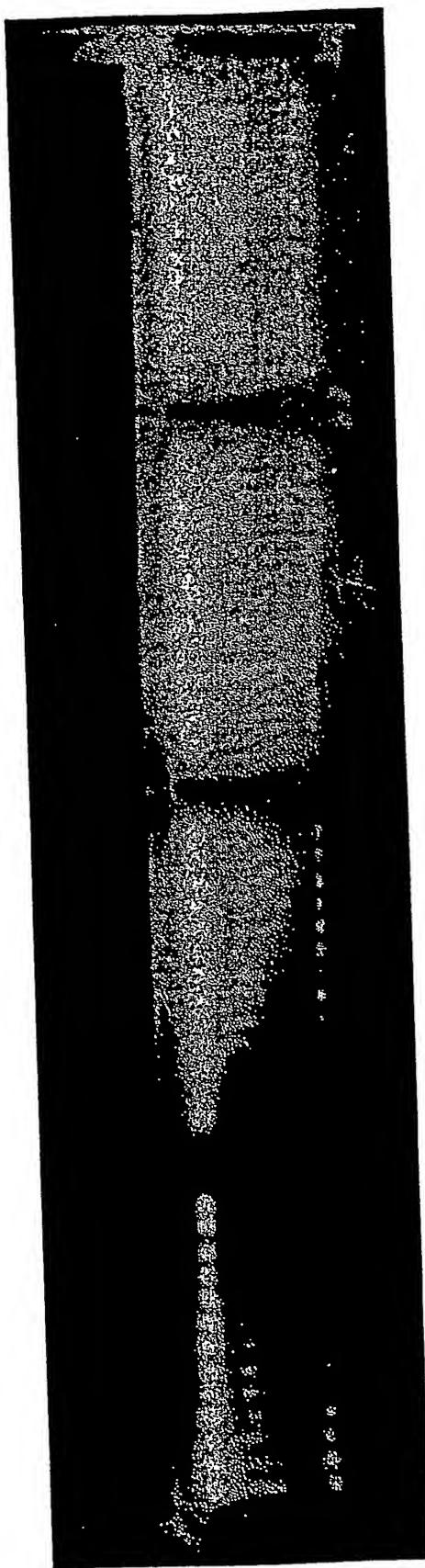


Fig. 3

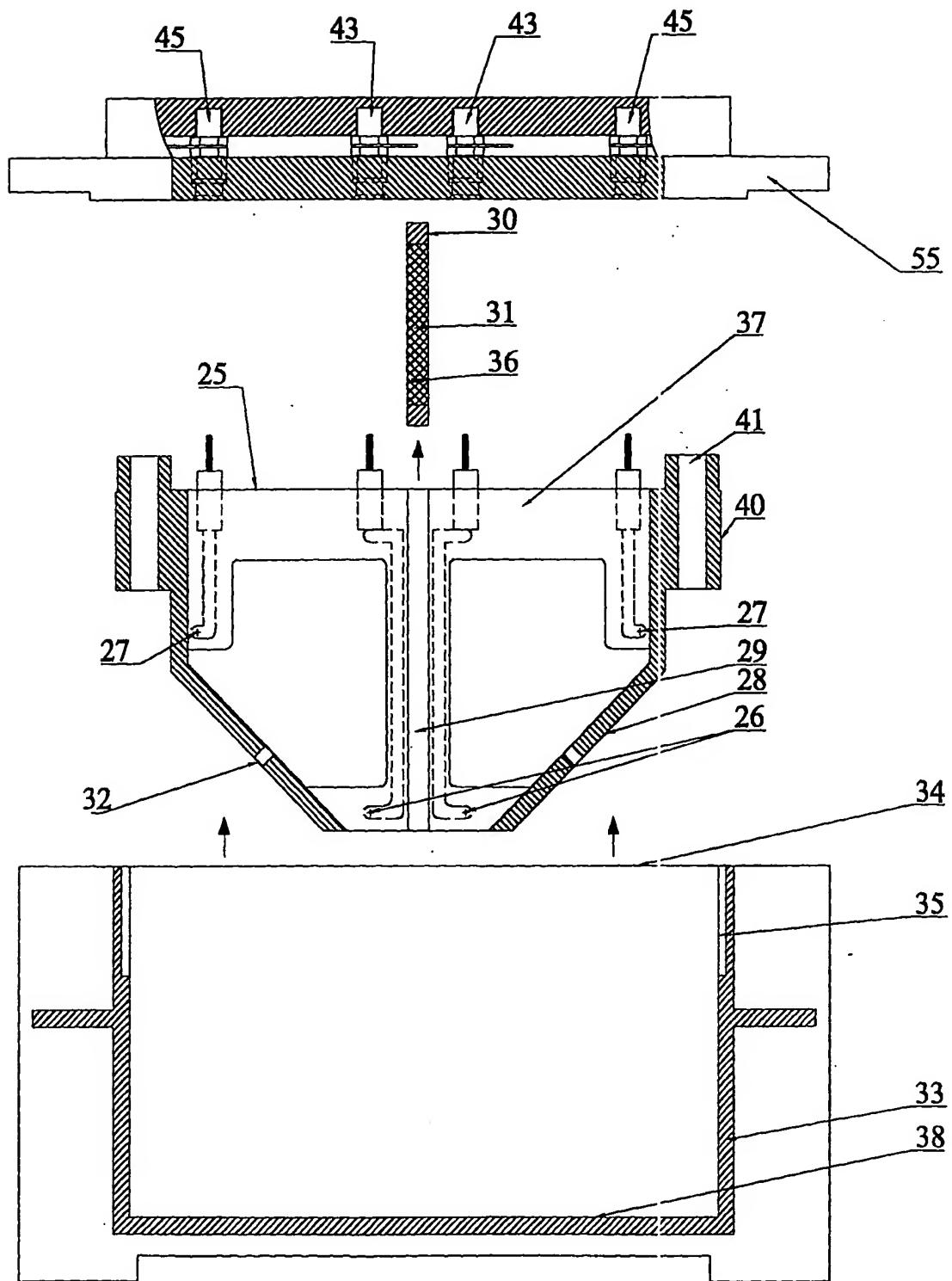


Fig. 4

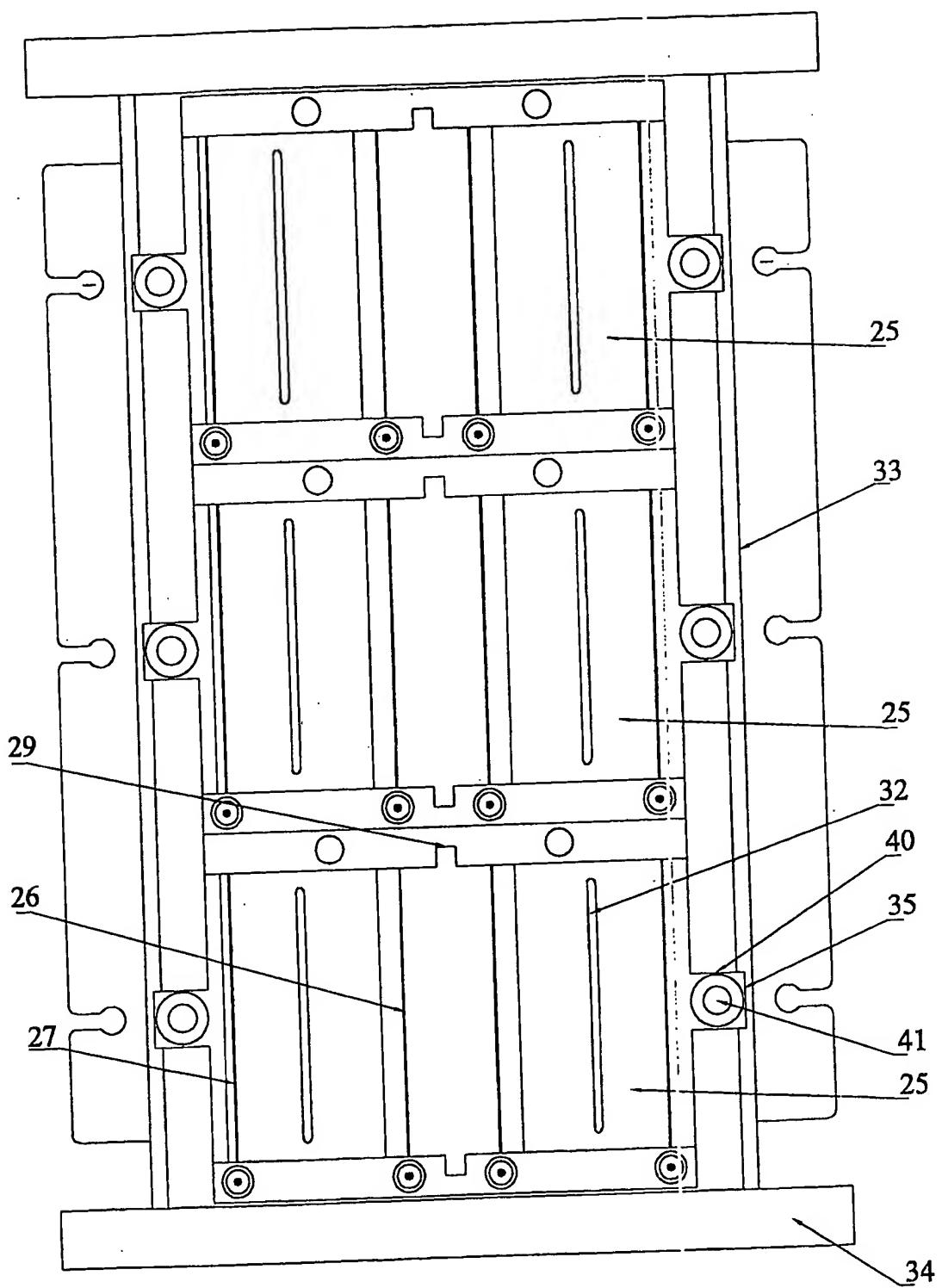


Fig. 5

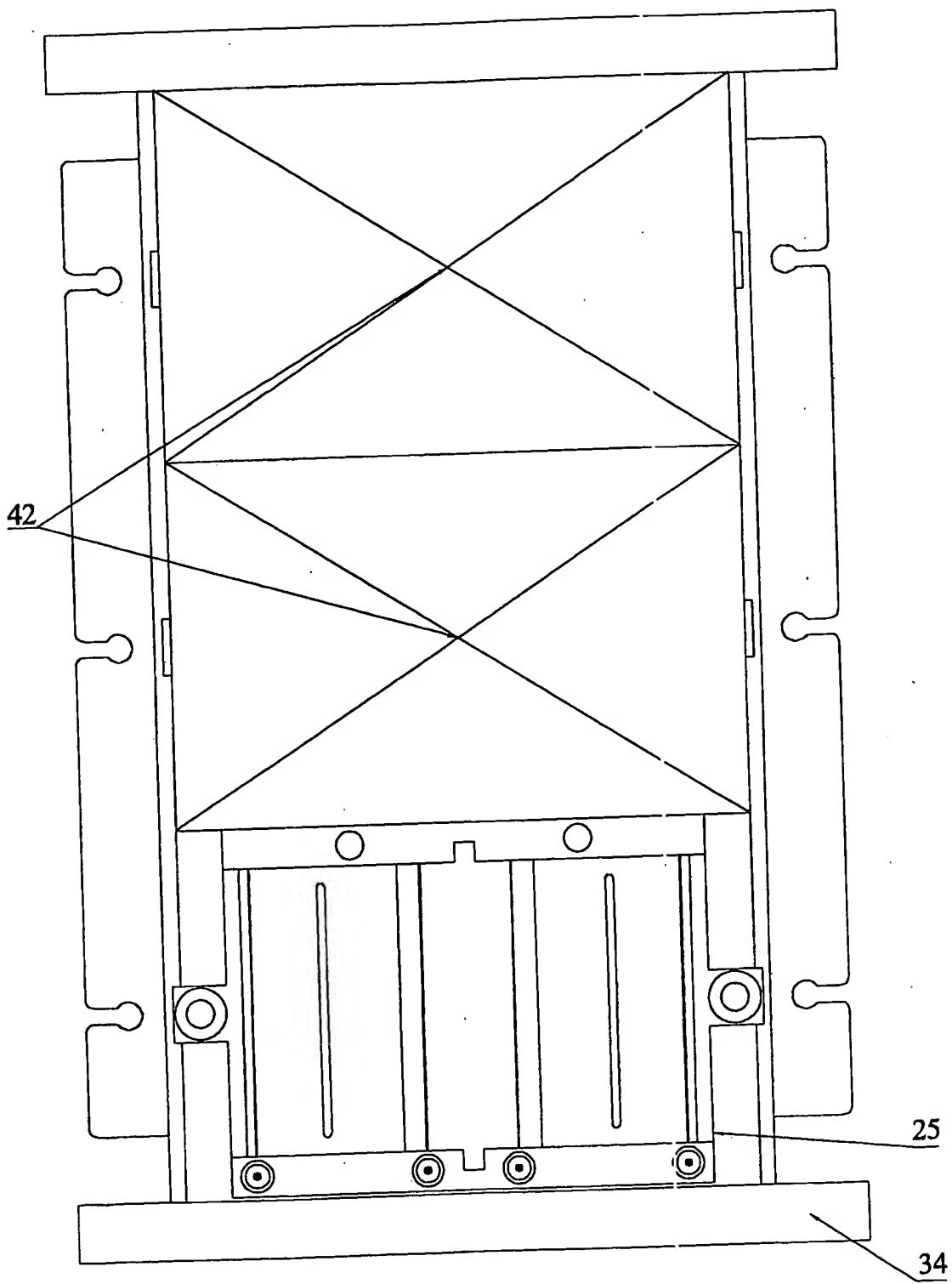


Fig. 6

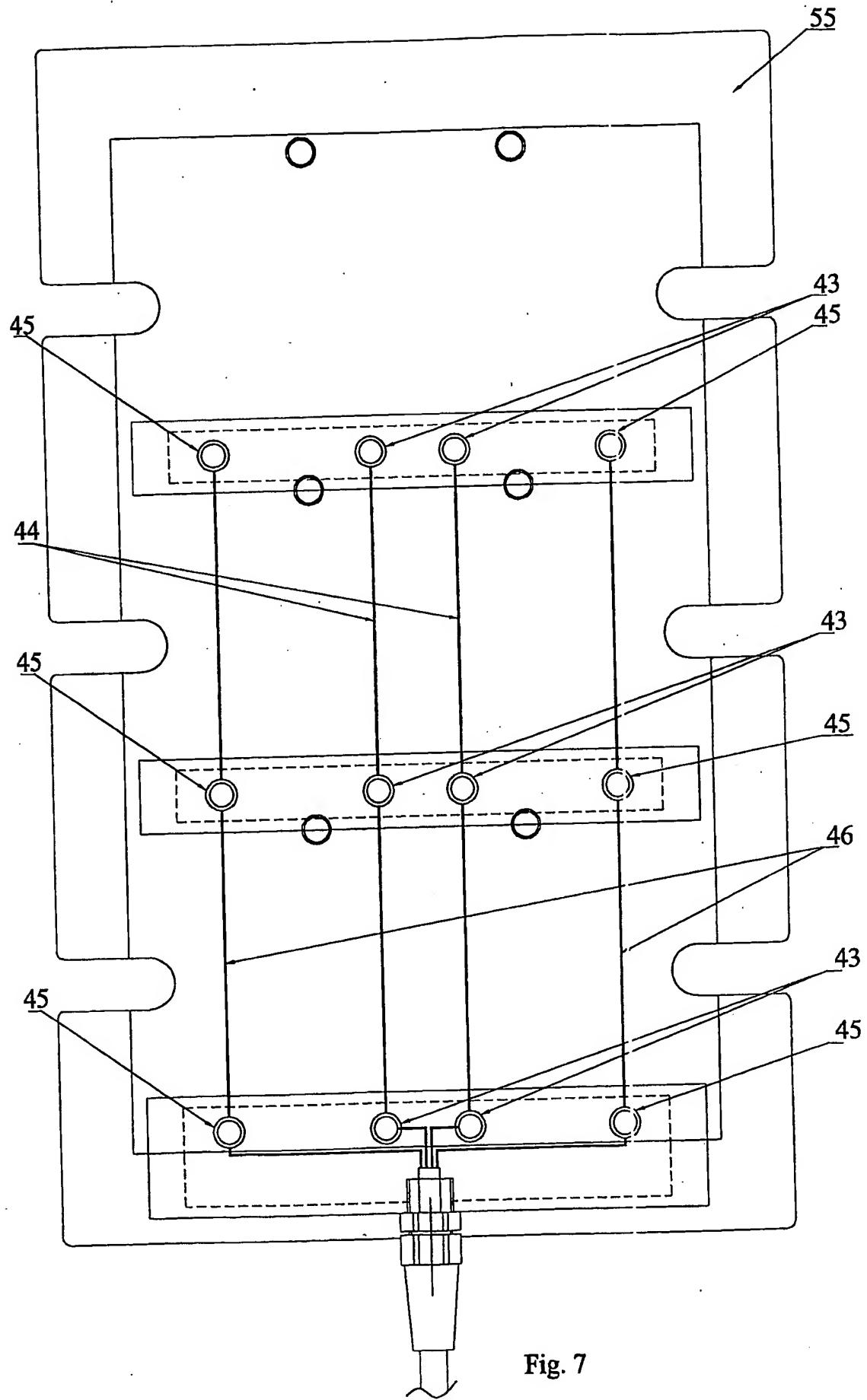


Fig. 7